

Foto: Arquivo



## Análise do Perfil Metabólico da Casca de Laranja Doce Diagnosticada com Morte Súbita dos Citrus por RMN

Rosilene Aparecida Prestes<sup>1</sup>  
Luiz Alberto Colnago<sup>2</sup>  
Lucimara Aparecida Forato<sup>3</sup>  
Emanuel Carilho<sup>4</sup>  
Renato Beozzo Bassanezzi<sup>5</sup>

A Morte Súbita dos Citrus (MSC) é uma nova doença que contamina plantas cítricas em algumas combinações copa/porta enxerto, como laranja doce sobre limão cravo. Essa doença foi observada pela primeira vez por pesquisadores do Fundecitrus, em 2001, em Comendador Gomes, Minas Gerais, em talhões de Valência, enxertados sobre limão Cravo, com idade de 12 anos. Em um dos talhões, com 4,7 mil plantas, em dezembro de 1999 foram encontradas 518 plantas mortas devido a causas até então desconhecidas e hoje atribuídas à MSC.

A MSC desenvolve-se com rapidez em laranjas de variedades tardias (Natal e Valência), na primavera e início do verão, variedades Pêra-Rio e Hamlin com idade entre 4 e 15 anos, e variedades Westin e Pinapple, sendo que todas estas variedades tinham como porta enxerto limão Cravo. A única variedade afetada tendo como porta enxerto limão Volcameriano foi a Natal. A MSC parece estar relacionada ao porta-enxerto, uma vez que laranjeiras Natal com 20 anos de idade, enxertadas em tangerina Cleópatra, próximas de pomares afetados, não manifestam sintomas, assim como Pêra, Hamlin e Westin enxertadas em Cleópatra, trifoliata e citrumelo Swingle com um, cinco e dois anos de idade respectivamente.

As plantas atingidas pela MSC apresentam perda

generalizada do brilho das folhas, que fica verde clara e pálida, contrastando com o verde escuro e intenso das plantas saudáveis. Em seguida ocorre um desfolhamento das plantas doentes, com poucas brotações externas e internas na copa das plantas. Em estágio mais avançado, pode ocorrer a morte da planta dependendo da variedade da copa. Estes sintomas são inespecíficos e refletem a ausência ou a grande quantidade de raízes mortas. As raízes morrem sempre da ponta para a base. Plantas com copas sem sintomas podem apresentar alguma podridão inicial nas extremidades das raízes. A destruição do sistema radicular é consequência da desorganização do floema funcional na região logo abaixo do ponto de enxertia, impedindo a nutrição adequada das raízes ou radículas. A característica mais acentuada nas plantas com MSC é a presença de coloração amarelada nos tecidos internos da casca do porta enxerto, na região do floema funcional, que fica completamente obstruído, afetando o sistema radicular.

Algumas variações de sintomas podem ocorrer em função da variedade da copa de laranja doce. Nas variedades precoces (Hamlin e Westin) e de meia estação (Pera) a evolução do sintomas é lenta. Geralmente a morte, quando ocorre, pode levar alguns meses. No entanto a planta se torna improdutiva logo com o aparecimento dos primeiros sintomas.

<sup>1</sup> Bióloga, doutorando do IQSC, USP - São Carlos - SP

<sup>2</sup> Pesquisador, Farmacêutico, Dr., Embrapa Instrumentação Agropecuária, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP, colnago@cnpdia.embrapa.br

<sup>3</sup> Química, Pós doutoranda na Embrapa Instrumentação Agropecuária, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP, lucimara@cnpdia.embrapa.br

<sup>4</sup> Químico, Prof. Doutor, Fundecitrus

<sup>5</sup> Eng. Agrônomo, Prof. Doutor, Fundecitrus

Os sintomas da MSC podem ser confundidos com as do Declínio, outra doença que debilita e reduz a longevidade de plantas, principalmente das enxertadas sobre limão cravo. No entanto há algumas diferenças básicas entre essas doenças. No Declínio não há o amarelecimento da casca, não há podridão das raízes, há intensa emissão de brotação na copa, não há morte de plantas com retenção de frutos e é constatada em laboratório a presença de uma proteína de 12 kDa, a qual não ocorre na MSC.

Após várias tentativas de isolamento, testes diagnósticos, baseados em serologia e biologia molecular e observações em microscópio eletrônico nenhum patógeno como nematóide, fungo, bactéria, fitoplasma, espiroplasma, protozoário ou vírúide foi, até o momento, associado a MSC. A hipótese mais aceita até agora é que a MSC seja causada por um novo vírus, muito provavelmente uma nova estirpe do Vírus da Tristeza dos Citrus (CTV), que tornou as combinações de laranja doce sobre limão cravo ou volkameriano, antes tolerantes em susceptíveis.

A MSC tem muitos pontos em comum com a Tristeza ou "Declínio Rápido" das laranjas doce enxertadas sobre laranja azeda. Os pés-francos de limão cravo e volkameriano são tolerantes a MSC assim como os de laranja azeda à Tristeza. Os sintomas da MSC e Tristeza são de declínio rápido, causados pela necrose do floema do porta enxerto, abaixo do ponto de enxertia e consequentemente a podridão das raízes. Os estudos epidemiológicos têm revelado que a distribuição espacial e velocidade de progresso da MSC é muito semelhante ao da Tristeza na presença de pulgão preto (*Toxoptera citricida*). Plantas com MSC, assim como plantas com Tristeza, podem ser recuperadas pela sub-enxertia com porta-enxertos tolerantes. Além disso, nenhum outro tipo de vírus foi encontrado nas plantas com MSC, a não ser partículas semelhantes ao CTV, que também é encontrado em plantas sadias.

A doença causada pelo vírus da tristeza dos citrus (CTV) é uma das mais importantes e danosas economicamente na citricultura mundial. O CTV pertence ao gênero Cloterovirus, família Closteroviridae, sendo um vírus filamentosos que possui o RNA variando de 6,5 a 7,0.10<sup>-6</sup> bases. Os membros deste grupo formam uma partícula longa, fina e flexível, com uma estrutura aberta facilmente reconhecida no microscópio eletrônico e apresentam uma camada simples de proteínas que varia de 23 a 25 kDa. O comprimento médio das partículas é de 2000 nm e diâmetro de aproximadamente 12 nm.

O CTV é transmitido no campo por afídeos e há diferentes espécies que propagam a doença com diferentes graus de eficiência. O mais eficiente vetor do CTV é o *Toxoptera citricidus*<sup>7</sup>. O vírus infecta o floema da planta hospedeira, que apresenta um rápido declínio ou morte. Este declínio também pode se estender por um período de anos, sendo acompanhado pela perda em produtividade e redução do crescimento da planta e do fruto

O objetivo principal desse trabalho foi avaliar as alterações metabólicas causadas pela morte súbita dos

Citrus (MSC) em plantas de laranja doce enxertadas sobre limão cravo, com a espectroscopia por RMN. Esses resultados poderão ajudar a entender o mecanismo de ação do agente patológico e como ele conduz a morte das plantas, bem como levar a proposição de tratamentos culturais/medidas profiláticas e de controle, reduzindo ou eliminando o impacto da doença na citricultura.

As amostras de casca de limão cravo (cavalo) e de copa de valência foram coletadas no município de Colômbia, São Paulo, por técnico do Fundecitrus e classificadas em nível 0 (assintomáticas) e nível 2 (com sintoma agudo da MSC). As cascas foram analisadas em um espectrômetro de RMN de 9.4 Tesla da Varian.

## Resultados

Como trata-se de uma doença nova com poucas informações sobre o agente causador e seu mecanismo de ação em nível bioquímico, fez-se uma avaliação do perfil metabólico e dos principais componentes das cascas das plantas contaminadas e não contaminadas com MSC, com espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).

Na tabela 1 estão os dados dos produtos da extração em hexano e etanol/água tanto das cascas dos cavalos sintomáticos e não sintomáticos quanto das respectivas cascas das copas. Nesta tabela pode-se ver que há uma maior quantidade de extrato em hexano (óleo) nas cascas (cavalo e copa) das plantas sintomáticas do que das plantas não sintomáticas. No extrato etanol/água somente a casca do cavalo contaminado apresentou maior quantidade de extrato bruto.

Tabela 1. Porcentagem do extrato das cascas de copas e cavalos de plantas com e sem MSC.

	Cavalo doente	Cavalo sadio	Copa doente	Copa sadia
Hexano	2,5	1	2	0,5
Álcool/água	18,5	14	14	13,5

Tanto os espectros de FTIR e RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C demonstraram que os extratos em hexano são de triglicerídeos. Na figura 1 está um espectro típico de RMN de <sup>13</sup>C do extrato em hexano da casca de cavalo com sintomas. Esse espectro é típico de triglicerídeos de ácidos graxos insaturados com os sinais dos carbonos do glicerol em 62 e 69ppm, dos carbonos insaturados entre 126 e 131ppm, carboxila em 173ppm e carbono de alifáticos insaturados entre 35 e 15ppm.

Na figura 2 está uma expansão da região de carbonos insaturados entre 126 e 131ppm, onde são identificados quatro sinais de maior intensidade em 129,17; 128,96; 127,03 e 126,87ppm relativo aos carbonos insaturados do ácido linoleico, seis sinais de média intensidade em 130,89; 128,92; 127,25; 127,20; 126,70 e 126,01ppm relativo aos carbonos insaturados do ácido linolênico e dois sinais de baixa intensidade em 128,79 e 128,65 relativos aos carbonos insaturados do ácido oleico.

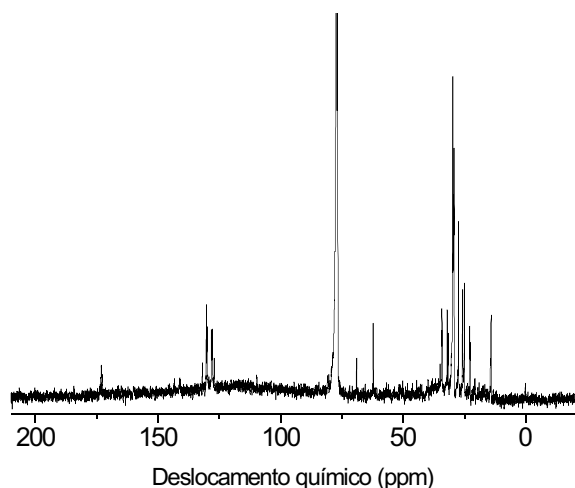


Figura 1. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de uma amostra de extrato hexânico de casca de cavalo de limão cravo de planta com MSC.

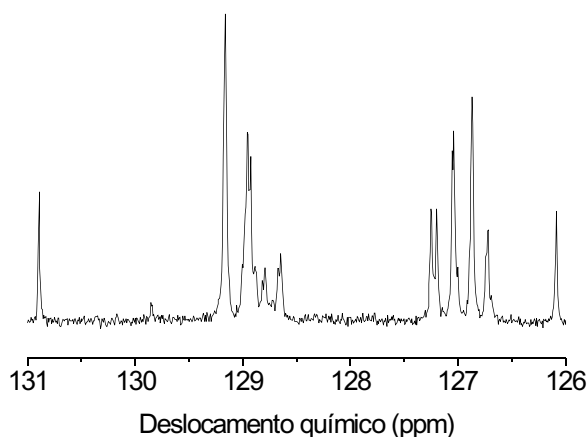


Figura 2. Expansão do espectro da figura 1, demonstrando a região de insaturação entre 131 e 126 ppm.

No caso dos extratos em etanol/água, somente a casca do cavalo da plantas contaminadas apresentou maior quantidade de material solúvel, cuja análise por RMN de  $^{13}\text{C}$  (figura 3) demonstrou principalmente os 12 sinais da sacarose em 105; 93; 82; 77; 75; 73,5; 73; 71; 70; 63,5; 62; 61 ppm e sinais que são atribuídos a ácido glutâmico/glutamina em 56; 43; e 28 ppm e prolina em 62; 47; 30 e 24 ppm. Os sinais das carboxilas desses aminoácidos foram observados em alguns espectros em 182, 179, 175, 174 ppm.

Na figura 4 estão os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das cascas de cavalo e copas de plantas sintomáticas e assintomáticas. Nos espectros de  $^1\text{H}$  os sinais são bastante largos, devido a diferença susceptibilidade magnética, mas é possível observar além do sinal intenso da água em 4,7 ppm, o sinais de açúcar em 3,7 ppm, um ombro no sinal da água e os sinais abaixo de 2 ppm que são de ácidos graxos de triglicerídeos. Como pode-se ver nas amostras com sintomas tanto nas casca da copa quanto do cavalo, há uma maior quantidade de açúcares e óleo do que nas plantas assintomáticas. Pode-se observar também que a quantidade de óleo e açúcares é maior no cavalo que na copa das plantas com sintomas e sem sintomáticas.

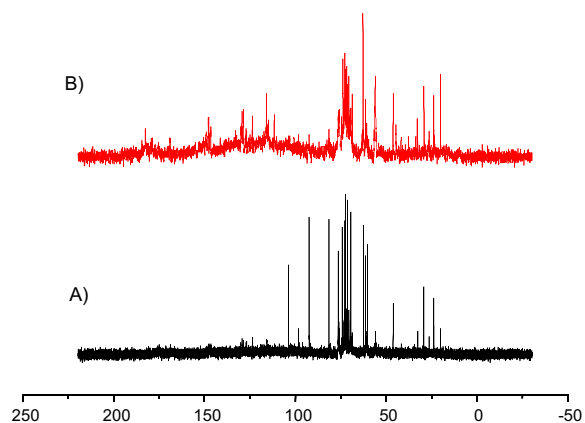


Figura 3. Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos extratos em etanol/água das cascas de cavalo de plantas com (A) e sem MSC (B).

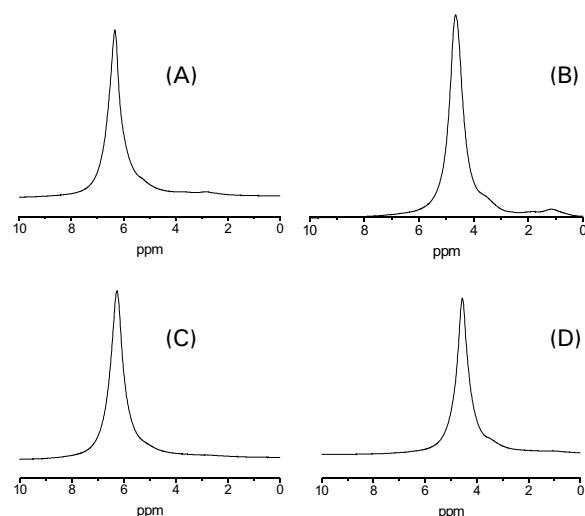


Figura 4. Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  da casca de limão cravo (cavalo) e copa de laranja valência. (A) Cavalo de planta assintomática; (B) Cavalo de planta com MSC, (C) Copa de planta assintomática e (D) Copa sintomática.

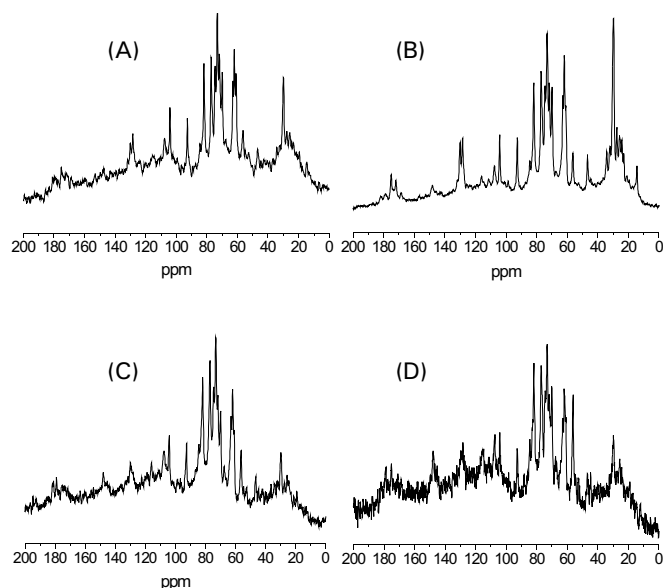


Figura 5. Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  da casca de limão cravo (cavalo) e copa de laranja valência. (A) Cavalo de planta assintomática; (B) Cavalo de planta com MSC, (C) Copa de planta assintomática e (D) Copa sintomática.

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  das cascas de cavalos e copa sintomáticas e não sintomáticas estão na figura 5. Nesta figura pode-se ver os sinais intensos entre 14 e 34 ppm e em 128 a 131 ppm de ácidos graxos insaturados de triglicerídeos, os 12 sinais da sacarose em 105; 93; 82; 77; 75; 73,5; 73; 71; 70; 63,5; 62; 61 ppm e sinais em 56 e 47 ppm, que podem ser atribuídos aos aminoácidos glutamina e ácido glutâmico, que tem sinal em 54 e 55 ppm e prolina, que tem sinal em 47 ppm. Os sinais das carboxilas desses aminoácidos podem ser observadas em 182, 179, 175, 172 e 169 ppm. Os sinais das carboxilas do ácido glutâmico absorvem em 182 e 175 ppm, da glutamina em 179 e 174 ppm e da prolina em 175 ppm. O sinal em 169 ainda não foi identificado. Os outros sinais dos aminoácidos que se sobrepõem aos dos ácidos graxos e sacarose e não puderam ser identificados.

Com os esses resultados pode-se concluir que a RMN de  $^{13}\text{C}$  pode ser usada para estudar a variação dos metabólitos de plantas com MSC tanto na forma de extratos quanto diretamente nas cascas. A vantagem da análise nas cascas é que permite medir ao mesmo tempo tanto os triglicerídeos (obtidos em extratos em hexânico) quanto os compostos solúveis em água, como açúcares e amino ácidos. Atualmente essas técnicas estão sendo usadas para determinar a variação temporal desses compostos em função de clima, chuvas, idade entre outras variáveis.

#### Referência Bibliográfica

BASSANEZI, R. B.; FERNANDES, N.G.; YAMAMOTO, P.T. Morte súbita dos Citrus. Araraquara, SP: Fundecitrus, 2003. 54 p. (Boletim citrícola, 24).

#### Comunicado Técnico, 55

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

**Embrapa Instrumentação Agropecuária**  
Rua XV de Novembro, 1542 - Caixa Postal 741  
CEP 13560-970 - São Carlos-SP  
**Fone:** 16 3374 2477  
**Fax:** 16 3372 5958  
**E-mail:** sac@cnpdia.embrapa.br  
www.cnpdia.embrapa.br

**1a. edição**

1a. impressão 2003: tiragem 300

#### Comitê de Publicações

**Presidente:** Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso  
**Secretária Executiva:** Janis Aparecida Baldovinotti  
**Membros:** Dr. Odílio Benedito Garrido de Assis,  
Dr. João de Mendonça Naime,  
Dr. Rubens Bernardes Filho,  
Dr. Washington Luiz de Barros Melo  
**Membro Suplente:** Débora Marcondes B. P. Milori

#### Expediente

**Supervisor editorial:** Dr. Odílio B. Garrido de Assis  
**Revisão de texto:** Janis Aparecida Baldovinotti  
**Tratamento das ilustrações:** Valentim Monzane  
**Editoração eletrônica:** Valentim Monzane